

OBRA DESARROLLADA

El péptido sintético GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing Peptide 6) es un péptido sintético de 6 aminoácidos (His-(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH₂, MW = 872.44 Da) y constituye un agonista del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento. Los secretagogos endógenos de la hormona de crecimiento y los compuestos análogos a los secretagogos, poseen numerosas funciones, que no se limitan a la liberación controlada de hormona de crecimiento, sino que incluye: el control y regulación del apetito y la ganancia de peso, la estimulación del sistema inmune, la cardioprotección, entre otras. La mayoría de los efectos de estos compuestos se han observado en mamíferos, aves y peces. El presente trabajo trata de la demostración del efecto del péptido GHRP-6 sobre el crecimiento y la estimulación del sistema inmune en peces y crustáceos. Este compuesto podría emplearse en la acuicultura como estimulador del crecimiento y del sistema inmune de estos organismos. Con el propósito de evaluar el efecto del péptido GHRP-6 sobre el crecimiento y el sistema inmune de tilapia (*Oreochromis sp.*), y camarón (*Litopenaeus schmitii* y *Litopenaeus vannamei*). .

La acuicultura es parte de la solución para la creciente demanda mundial de alimentos, fundamentalmente como fuente de proteína animal. Sin embargo, los rendimientos actuales no son suficientes para que este sector desempeñe su papel crucial. En este sentido, la estimulación de la tasa de crecimiento es uno de los enfoques que se han evaluado. También constituyen un problema significativo las pérdidas provocadas por bacterias, virus y parásitos. Sin embargo, se ha demostrado que los estimulantes del crecimiento contribuyen no solo a la potenciación del mismo sino también al buen desempeño de la salud animal.

De manera general, la ruta oral constituye la aproximación más deseable y práctica para la administración de compuestos que promueven el crecimiento en peces y crustáceos de cultivo, debido a que la alimentación no provoca ningún estrés a estos organismos mientras son tratados. Es por ello que se realizaron experimentos para evaluar el efecto biológico del péptido sintético GHRP-6 en tilapias (*Oreochromis sp.*) sobre la estimulación del crecimiento y de parámetros del sistema inmune innato, con vistas a su futuro empleo en la acuicultura. En juveniles de tilapia se evaluaron dos variantes de administración en dos experimentos diferentes: el péptido GHRP-6 encapsulado en quitosano y alginato de calcio y sin encapsulación. La figura 1 muestra que el péptido

GHRP-6 estimula el crecimiento en juveniles de tilapia cuando se administra oralmente ya sea encapsulado o no encapsulado.

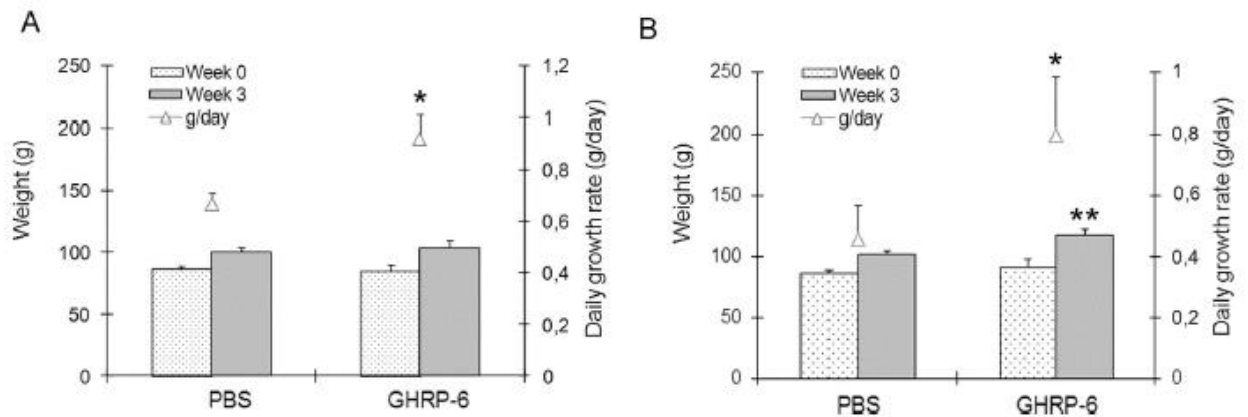


Figura 1. Efecto en el peso corporal y la razón de crecimiento diario de GHRP-6 administrado oralmente en forma no-encapsulada (A) y en forma encapsulada empleando quitosano y alginato (B) en juveniles de tilapia durante 3 semanas. Eje izquierdo: Peso (g). Eje derecho: razón de crecimiento diario (g/día). * indica $p < 0.05$; ** indica $p < 0.01$.

El péptido GHRP-6 fue incluido en el pienso y su efecto en el crecimiento de las larvas de tilapia fue evaluado por el incremento en el peso corporal y la concentración de proteínas en los homogenados totales de larvas. El péptido GHRP-6 estimuló significativamente el crecimiento de las larvas comparado con el grupo control negativo (Figura 2). De igual manera la concentración de proteínas totales resultó incrementada por el tratamiento con GHRP-6 comparada con el grupo control (Figura 3).

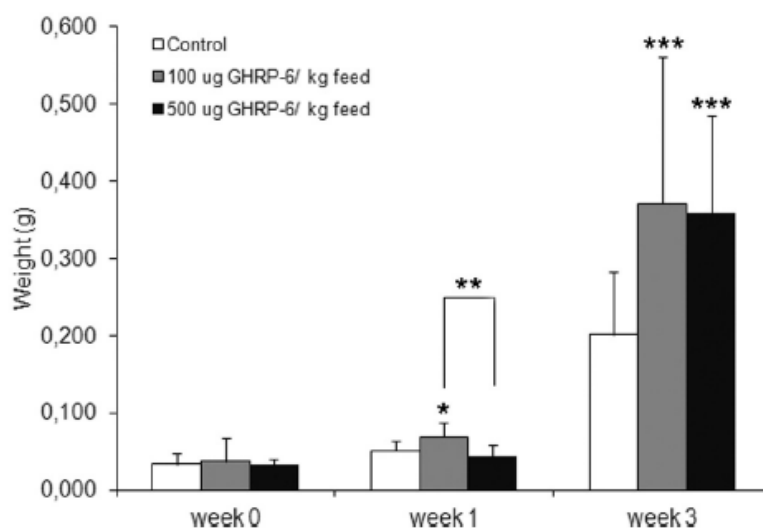


Figura 2. Experimento de crecimiento en larvas de tilapia alimentadas con el péptido GHRP-6. Control negativo: pienso sin péptido GHRP-6 incluido * indica $p<0.05$; ** indica $p<0.01$; *** indica $p<0.001$.

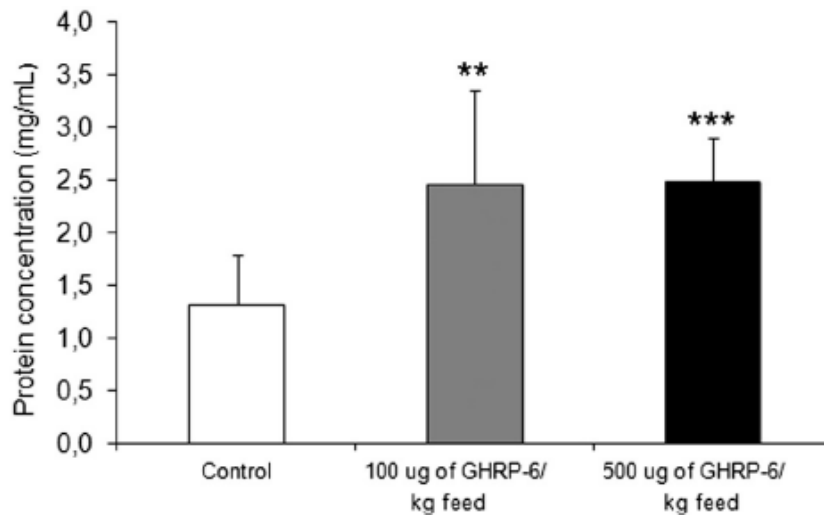


Figura 3. Concentración de proteínas totales en homogenados de larvas de tilapia alimentadas con el péptido GHRP-6. Control negativo: pienso sin péptido GHRP-6 incluido ** indica $p<0.01$; *** indica $p<0.001$.

La nutrición desempeña un papel importante en el funcionamiento de la respuesta inmune innata y esta es potenciada por aditivos o sustancias alimenticias. En este sentido se sabe que las interacciones proteínas-carbohidratos mediadas por lectinas son componentes fundamentales de la inmunidad innata. Además, algunas lectinas son efectores fundamentales de procesos tales como el reconocimiento de patógenos, la opsonización, la activación del complemento y la regulación de funciones inmunes. En este experimento, la administración de GHRP-6 en el pienso a larvas de tilapia aumentó los títulos de lectinas en el grupo tratado en comparación con el grupo control que no tuvo péptido incluido en el pienso (Figura 4 A). Por otra parte, los linfocitos intraepiteliales (IEL, por sus siglas en inglés) constituyen un componente del tejido linfoide asociado al intestino, y desempeña un papel fundamental en el mecanismo de defensa mucosal contra los antígenos intraluminales extraños. En este estudio, la administración del péptido GHRP-6 aumentó los IEL comparado con el grupo control que no tuvo péptido en el pienso (Figura 4 B).

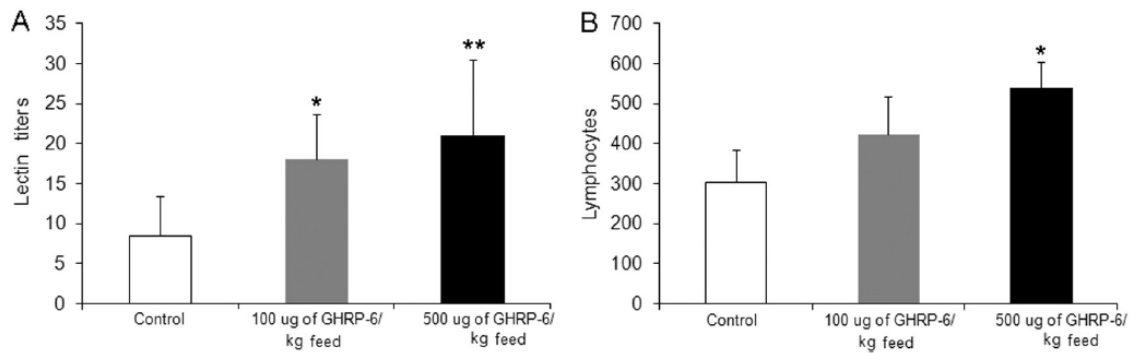


Figura 4. Parámetros inmunes en homogenados de larvas alimentadas con el péptido GHRP-6: Títulos de hemaglutinación de lectinas (A) y linfocitos intraepiteliales (B). Control negativo: pienso sin péptido GHRP-6 incluido (*) indica $p < 0.05$; (**) indica $p < 0.01$.

Los baños de inmersión son una práctica común en la acuicultura para administrar hormonas, péptidos, antibióticos, inmunoestimulantes y vacunas. En este estudio se realizaron experimentos para evaluar el efecto biológico del péptido sintético GHRP-6 en el crecimiento de larvas (protozoa I) de *Litopenaeus schmitii* (incremento del peso y la talla). El grupo tratado con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de péptido mostró un incremento significativo en estos parámetros comparado con el grupo control (Figura 5).

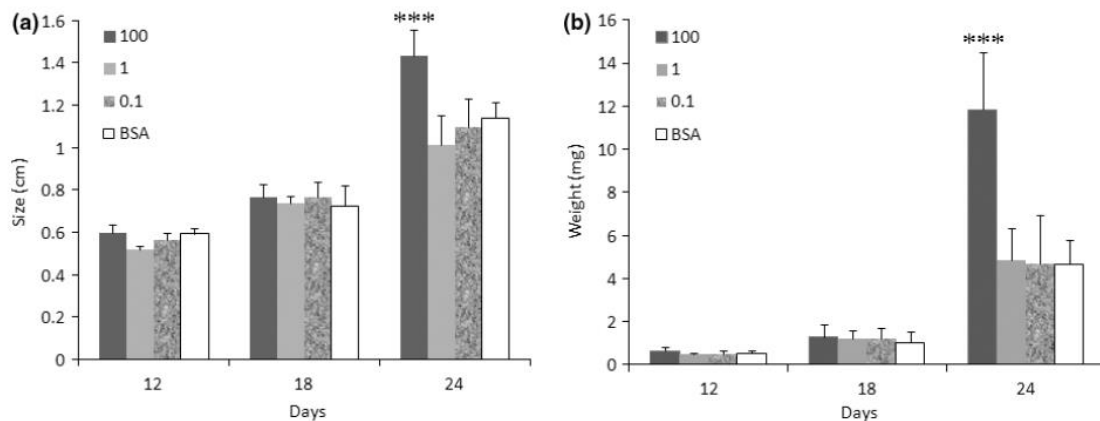


Figura 5. Experimento de crecimiento en larvas de *Litopenaeus schmitii* inmersas en el péptido sintético GHRP-6 durante 24 horas. (a) Talla en centímetros (cm). (b) Peso corporal en miligramos (mg). El grupo control negativo recibió BSA como una proteína no relacionada. *** indica $p < 0.001$.

El número de espinas rostrales y arcos branquiales son una medida del crecimiento y la calidad de las larvas en la cría de camarones. Particularmente, el desarrollo de las branquias es muy importante y puede inducir la protección contra el estrés osmótico,

especialmente durante períodos críticos de sus ciclos de vida. En este estudio las larvas del grupo tratado con la mayor dosis del péptido GHRP-6 mostraron un incremento en el número de arcos branquiales y de espinas rostrales (Figura 6) y a su vez tuvieron mayores niveles de supervivencia, comparado con el grupo control.

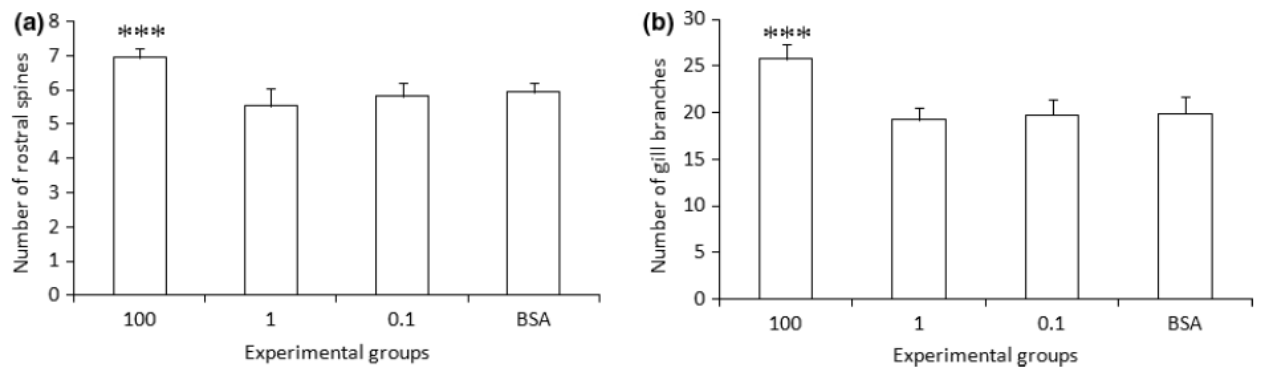


Figura 6. (a) Número de espinas rostrales y (b) arcos branquiales el día 24 del experimento de crecimiento de *Litopenaeus schmitii*, mediante baños de inmersión El grupo control negativo recibió BSA como una proteína no relacionada. *** indica $p < 0.001$.

El efecto del péptido GHRP-6 en el crecimiento de post-larvas de *Litopenaeus vannamei* fue evaluado mediante el peso corporal y el incremento de la talla. La administración del péptido ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) mediante baños de inmersión permitió un incremento significativo en el peso corporal y la talla comparado con el grupo control (Figura 7).

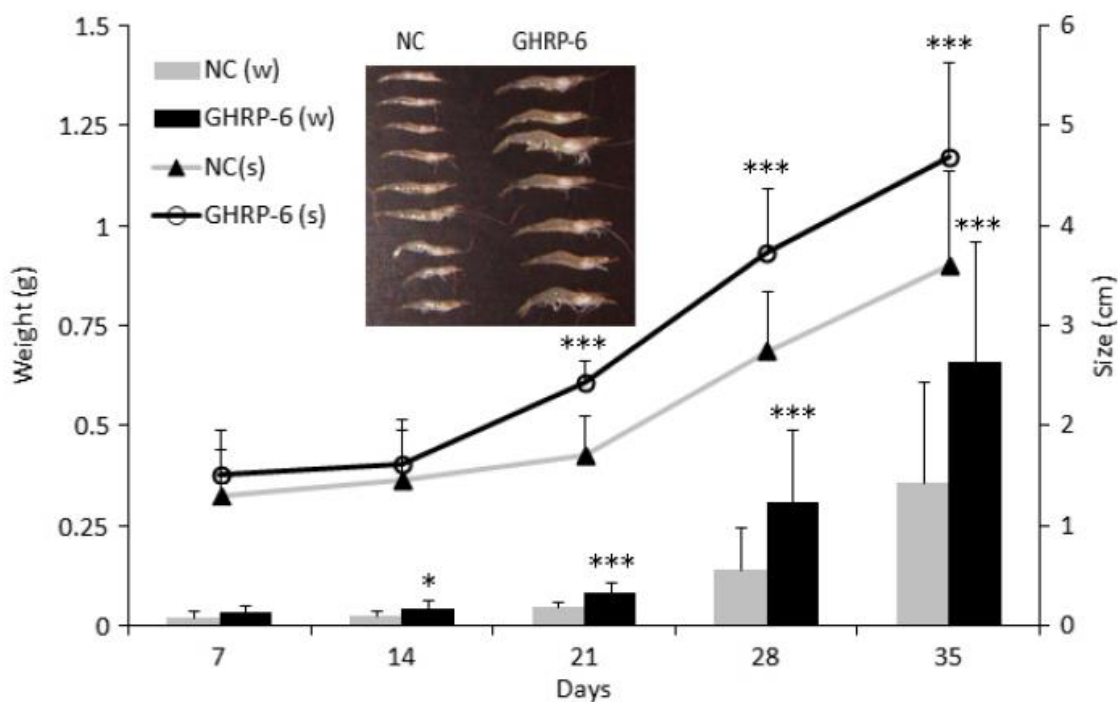


Figura 7. Experimento de crecimiento en post-larvas de *Litopenaeus vannamei* inmersas en GHRP-6 durante 35 días. Eje izquierdo: peso corporal (w en la leyenda) en gramos (g). Eje derecho: tamaño (s en la leyenda) en centímetros (cm). La figura arriba corresponde a muestras a los 35 días de tratamiento. * indica $p < 0.05$; *** indica $p < 0.001$.

En camarones peneidos, un mayor contenido de proteínas solubles ha sido asociado con los animales que muestran la mayor tasa de crecimiento. En este trabajo, el mayor contenido de proteínas se observó en las larvas tratadas con GHRP-6 (Figura 8 A), indicando una conexión con el metabolismo proteico.

Por otra parte, el conteo total de hemocitos (THC, por sus siglas en inglés) ha sido informado como un indicador potencial de la respuesta inmune en crustáceos, especialmente en camarones, y un número superior al normal de hemocitos circulantes en estos organismos se correlaciona con una resistencia incrementada a los patógenos. En este estudio, los THC resultaron incrementados en *L. vannamei* tratados con GHRP-6, comparado con el grupo control (Figura 8 B).

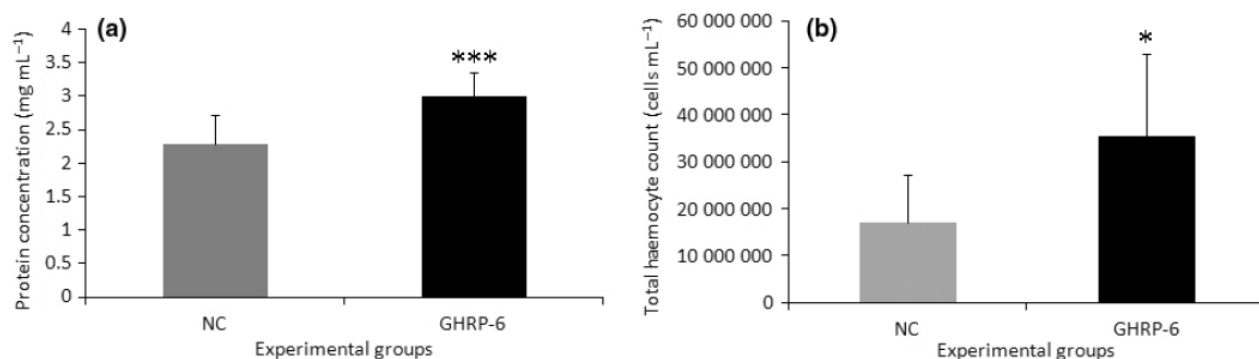


Figura 8. (a) Concentración de proteínas totales en homogenados de camarones. (b) Número total de hemocitos en la hemolinfa de camarones en el día 35 del experimento de crecimiento en *Litopenaeus vannamei*. * indica $p < 0.05$; * indica $p < 0.001$.**

En la industria de la acuicultura, la prevención de enfermedades mediante la vacunación constituye el método más apropiado para el control de patógenos tanto desde el punto de vista económico como el ambiental. Es por ello que constituye un objetivo de esta industria la búsqueda de moléculas alternativas o ciertas combinaciones de ellas como adyuvantes con el fin de incrementar el bienestar de los animales sin reducir los niveles de protección. De esta manera, se evaluó el efecto del péptido GHRP-6 sobre el sistema inmune, con vista a su futuro empleo en la acuicultura. Para ello se realizó un experimento de inmunización en tilapias (*Oreochromis niloticus*), a las que se les co-administró por vía intraperitoneal el péptido y un antígeno quimérico de subunidad obtenido por vía recombinante (P0-my32Ls). El péptido GHRP-6 estimuló significativamente los títulos de anticuerpos de los peces, comparado con el grupo que solo recibió el antígeno y con el grupo control negativo que no recibió tratamiento (Figura X). De igual manera, hubo mayor número de peces respondiendo contra my32 y P0 (títulos de anticuerpos ≥ 100) en el grupo inmunizado con el antígeno y GHRP-6 (75 y 100% respectivamente) comparado con el grupo P0-my32Ls (25 y 17% respectivamente). Además, se realizó un experimento de inmunización en clarias (*Clarias gariepinus*) empleando otro antígeno recombinante (P0-TT) en combinación con el péptido GHRP-6, donde se observó igualmente una estimulación significativa de los títulos de anticuerpos de los peces, comparado con el grupo que solo recibió el antígeno y con el grupo control negativo que no recibió tratamiento (Figura Y).

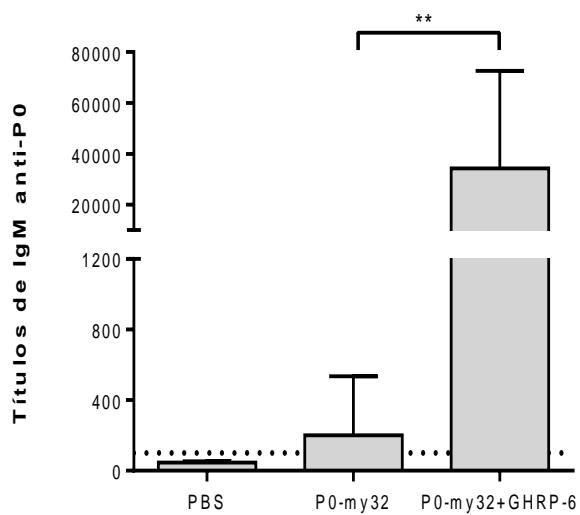
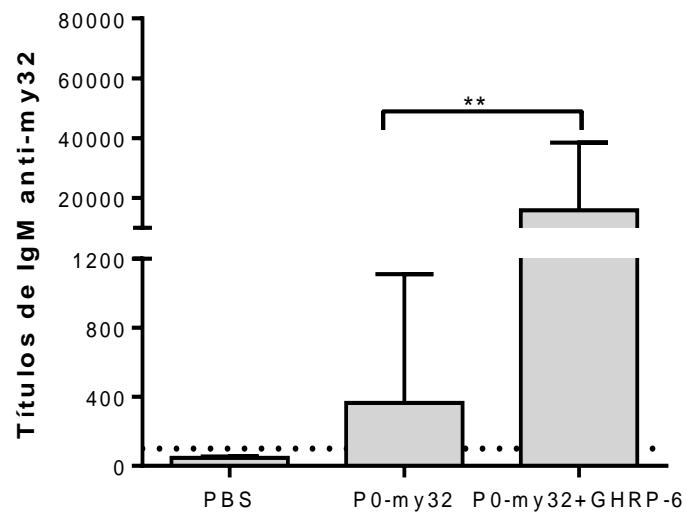


Figura X Respuesta de anticuerpos en tilapias (*O.niloticus*) inmunizadas con una mezcla del antígeno P0-my32Ls y el péptido GHRP-6. ** indica diferencias significativas $p < 0.01$.

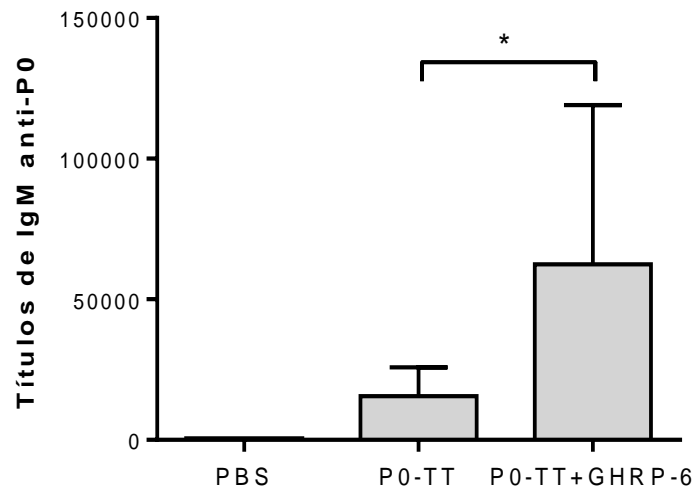


Figura Y Respuesta de anticuerpos en clarias (*C. gariepinus*) inmunizadas con una mezcla del antígeno P0-TT y el péptido GHRP-6. * indica diferencias significativas $p < 0.05$.